动 物 学 研 究 2008，Aug. 29(4)：405-414　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　doi:10.3724/SP.J.1141.2008.04405

饲养层 FGF2 表达量对猕猴胚胎干细胞自我更新及多能性的影响

张 敬[1,2]，魏 强[1,2]，卢 斌[1,2]，陈永昌[1,2]，陈洪伟[1,2]，李荣荣[1,2]，王喜宏[1,2]，季维智[1,*]

（1. 中国科学院昆明动物研究所，云南 昆明 650223；2. 中国科学院研究生院，北京 100049）

摘要：用转基因和 RNA 干扰（RNAi）法建立 5 组不同成纤维细胞生长因子-2（fibroblast growth factor -2，FGF2）表达量的猕猴耳部皮肤成纤维细胞（MESF）系：过表达 FGF2 组（f1），过表达的阴性对照组（f2），FGF2 RNA 干扰组（f3），RNA 干扰的阴性对照组（f4）和未作任何处理的对照组（f5）。5 组 MESF 的 FGF2 表达量相对值为 f1：f2：f3：f4：f5＝4∶2∶1∶2∶2；c-fos，TGF-β1，INHBA，Gremlin1 在 f1 中表达量上升，在 f3 中表达量下降；BMP4，TGF-β2 在 f1 中表达量下降，在 f3 中表达量上升；表明内源 FGF2 能够作用于 MESF 的 TGF-β 信号通路，引起相关基因表达量的变化。用这些细胞作为饲养层长期培养（10 代）猕猴胚胎干细胞（RhESC），结果在 f1 上培养的 RhESC 增殖速度都比对照组快，并且 c-fos，TGF-β1，INHBA，Gremlin1，Oct-4，Nanog，Sox2 表达量均上升，BMP4 表达下调；在 f3 上培养的 RhESC 增殖较慢，BMP4 表达上调，c-fos，TGF-β1，INHBA，Gremlin1，Oct-4，Nanog，Sox2 表达下调。5 组 MESF 上培养的 RhESC 形成的 EB 均表达各胚层早期标记基因 (marker)，说明 RhESC 的多能性没有受到影响，但表达量有差异，f1 上 RhESC 形成的 EB 所有 marker 都低表达。结果表明饲养层的 FGF2 含量不仅影响自身相关基因的表达，还对 RhESC 的自我更新有一定的作用。

关键词：猕猴；FGF2；饲养层；胚胎干细胞；增殖
中图分类号：Q813；Q959.848　　**文献标识码**：**A**　　**文章编号**：0254-5853-(2008)04-405-010

Influence of Different FGF2-expressing Feeder Layers on the Self-renewal and Pluripotency of Rhesus Monkey Embryonic Stem Cells

ZHANG Jing[1,2], WEI Qiang[1,2], LU Bin[1,2], CHEN Yong-chang[1,2], CHEN Hong-wei[1,2], LI Rong-rong[1,2], WANG Xi-hong[1,2], JI Wei-zhi[1,*]

(1. *Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan* 650223, *China;*
2 .*Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*)

Abstract: Transgene and RNAi were used to establish five different FGF2-expressing monkey ear skin fibroblast (MESF) cell lines, the FGF2 over-expressed line (f1), the negative control of f1 (f2), RNA interfered line (f3), the negative control of f3 (f4) and the non-treated control (f5). The expression ratio of FGF2 in these lines was f1: f2: f3: f4: f5=4∶2∶1∶2∶2. The results indicated that c-fos, TGF-β1, INHBA, Gremlin1 were upregulated in f1 but downregulated in f3, while BMP4, TGF-β2 were downregulated in f1 but upregulated in f3, which implied that endogenous FGF2 affected the TGF-β signaling pathway and the expression level of related genes changed in MESFs. Further analysis of rhesus monkey embryonic stem cells (RhESCs) supported by these MESFs showed that RhESCs on f1 grew more quickly than those in other groups, in which the expression level of c-fos，TGF-β1，INHBA，Gremlin1，OCT-4，Nanog and Sox2 was higher, while that of BMP4 was lower; in contrast, RhESCs on f3 grew more slowly than in other groups, in which the expression level of c-fos，TGF-β1，INHBA，Gremlin1，OCT-4，Nanog and Sox2 declined, while that of BMP4 and TGF-β2 increased. EBs from these RhESCs expressed early markers representing all germ layers,

收稿日期：2008-04-01；接受日期：2008-06-02
基金项目：973 计划（2006CB701505，2007CB947701）；中科院创新工程试点经费（KSCX2-YW-R-47）；国家自然科学基金（30570906，30700159，30700425）
*通讯作者（Corresponding author），E-mail: wji@mail.kiz.ac.cn
第一作者简介：张敬，Email：jingzhang22@yahoo.com.cn

but the expression levels of markers in RhESCs on f1 were lower than in other groups. These findings demonstrated that different FGF2 expression in feeder layers can not only influence expression of relative genes in MESFs, but also affect proliferation and self-renewal of ESCs.

Key words: Rhesus monkey; FGF2; Feeder layers; Embryonic stem cells; Proliferation

自我更新和多能性是胚胎干细胞（embryonic stem cells, ESC）的重要特征。维持 ESC 自我更新能力的关键在于抑制增殖过程中的细胞分化（Burdon et al, 2002）。目前，在体外长期培养 ESC 都需要饲养层或条件培养基和胞外基质（Reubinoff et al, 2000；Suemori et al, 2001；Xu et al, 2001；Wang et al, 2007）以维持其未分化状态。ESC 的分化受到内源信号及外部微环境的共同调控（Odorico et al, 2001；Bendall et al, 2007）。本实验室前期的研究发现，不同的猕猴饲养层对猕猴 ESC 生长和维持自我更新的能力不尽相同，并可能与饲养层中成纤维细胞生长因子-2（fibroblast growth factor-2，FGF2）的表达量有关（Li et al, 2005a）。

有报道表明 FGF2 对维持人 ESC 的多潜能是必需的，高浓度的 FGF2 能够维持 ESC 的自我更新（Wang et al, 2005a；Wang et al, 2005b；Xu et al, 2005a；Xu et al, 2005b）。人 ESC 的培养目前已经出现无血清无饲养层体系，并且能保持人 ESC 的长期自我更新（Li et al, 2005b）。在这种体系中，添加 FGF2 可以促进人 ESC 增殖；撤去 FGF2 就会导致 ESC 在 2 周内分化（Amit et al, 2000）。Vallier et al（2005）也证明 FGF2 和转化生长因子 β（transforming growth factor beta,TGFβ）家族成员协同作用而维持人 ESC 的长期自我更新。Jirmanova et al（1999）研究表明 FGF2 与其受体结合受细胞表面的蛋白多糖 O-linked Lewis X 调节，抑制 O-linked Lewis X 的合成会减弱小鼠 ESC 的增殖及 FGF2 对 ESC 的促有丝分裂作用，添加 O-linked Lewis X 可以加强 FGF2 对 ESC 的促有丝分裂作用。这些研究表明 FGF2 在 ESC 多潜能性维持方面发挥着重要作用。

本研究中建立了不同 FGF2 表达量的 MESF 细胞系，并将这些细胞系作为饲养层培养猕猴 ESC，通过比较其对 ESC 生长、自我更新及分化潜能的影响，探讨 FGF2 在饲养层和 ESC 生长中所起的作用。

1 材料与方法

1.1 培养液

成纤维细胞培养液（FCM）为 Dulbecco’s modified Eagle’s medium(DMEM) (Gibco)，含 10％新生牛血清（Hyclone）和 0.0627 g/L 青霉素和 0.1 g/L 链霉素（Sigma）。

胚胎干细胞培养基（ECM）：90％DMEM，2 mmol/L 的谷氨酰胺（Sigma），0.1 mmol/L β-球基乙醇，1％非必需氨基酸（Invitrogen），10％胎牛血清（defined fetal bovine serum, dFBS；Hyclone），0.0627 g/L 青霉素和 0.1 g/L 链霉素。

ESC 的分化液（DCM）：85％ DMEM/F12（1∶1）（Gibco），15％dFBS，1 mmol/L 谷氨酰胺，0.1 mmol/L β-巯基乙醇，1％非必需氨基酸。

1.2 细胞来源及培养

MESF 取自 1 周龄的猕猴胎儿耳部皮肤，在 FCM 中培养。经丝裂霉素 C 处理使其失去分裂活性，制备成饲养层。

R366.4 猕猴 ESC（RhESC）在 MESF 饲养层上用 ECM 培养。当 RhESC 集落生长到最大且无明显分化特征时，用 10 mg/mL dispase (Gibco)消化、收集 RhESC，然后接种至新的饲养层上。

1.3 拟胚体的形成

将 10 mg/mL dispase 消化、收集的 RhESC 悬浮于 DCM 中，并以 30 μL/滴（60 个细胞/μL）进行悬滴培养以形成拟胚体（embryoid body，EB）。1 天后，将 ESCs 转入铺有琼脂糖（Sigma）的洁净的细菌培养皿上继续悬浮培养。再过 3 天，收集 EB 提取 RNA。

1.4 shRNA 表达载体和 FGF2 表达载体的构建

根据猕猴 FGF2 蛋白编码序列，利用 Ambion 公司的在线软件 siRNA Target Finder (http: //www. ambion. com/techlib/misc/siRNA_finder. html) 设计出能够干扰 FGF2 的 shRNA 序列。该软件通过寻找 mRNA 序列中的 GG 双核苷酸以及其下游 GC 含量在 30％－50％之间的 19 个核苷酸来选择目标序列。在 GenBank 中编号为 XM_001099284.1 的序列第 4538－4558 个碱基位点 5′-AAG GAT TCT GGA GTA TA C TTA-3′ 这 21 个核苷酸被认为是有最大干扰效率的序列。寡核苷酸 5′-GAT CCG GAT

TCT GGA GTA TAC TTA TTT GTG TAG TAA GTA TAC TCC AGA ATC CTT TTT TGG AAA-3′和它的互补序列退火形成带 *Bam*HI 和 *Hind*III 两个粘性末端的双链 DNA，并与经由 *Bam*HI 和 *Hind*III（Fermentas）双酶切的 pSilencer 2.1-U6 neo vector(获赠于武汉大学生命科学院朱应教授)用 T4 DNA 连接酶（Fermentas）连接，4℃过夜。该载体含有人的 U6 RNA 聚合酶启动子。构建的产物命名为 pSilencer-sh FGF2。测序结果表明该构建出的载体中插入片段序列及方向都是正确的。这段序列会被转录成为短发夹状 RNA（shRNA）。阴性对照的载体 pSilener-Negative 中的序列是由 Ambion 公司提供的 5′-GAC TAC CGT TGT TAT AGG TGT-3′这 21 个核苷酸的无义序列。

构建猕猴 18kDa FGF2 基因表达载体的目的片段 FGF2 cDNA 是由 R366.4 猕猴胚胎干细胞中提取的 mRNA 经 RT-PCR 得到，所用的引物为：正义链 5′-CGG AAT TCA TGG CAG CCG GGA GCA TC-3′；反义链 5′-CCG CTC GAG TCA GCT CTT AGC AGA CAT-3′。PCR 的产物经 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切后插入 pcDNA3.1(+)（获赠于昆明动物研究所郑永唐研究员）载体中，命名为 pcDNA3.1(+)-FGF2。测序确认载体构建成功。

1.5　不同 FGF2 表达量的 MESF 饲养层的建立

将 1.4 中的各质粒分别转入 MSEF 细胞中，并用药物筛选得到稳定的细胞系。转染前 24 h，细胞铺于六孔板中生长。细胞被分为 4 组：转入质粒 pcDNA3.1(+)-FGF2 的为过表达组（f1），转入空载体 pcDNA3.1(+)的为过表达的阴性对照组（f2），转入质粒 pSilencer-shFGF2 的为干扰组（f3），转入质粒 pSilencer-negative 的为干扰的阴性对照组（f4）。使用转染试剂 siPORT *XP-1*（Ambion），按照该试剂的使用说明进行转染。5h 后，更换新鲜的 FCM。转染后 48 h，在培养基中加入浓度为 500 μg/mL 的 G418 进行药物筛选。20d 后，得到稳定的猕猴成纤维细胞系。除上述 4 组 MESF 细胞系外，将未转染的 MESF 记为第 5 组（f5）。

1.6　逆转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）

MESF（经丝裂霉素 C 处理）和 ESC 中总 RNA 用 TRIzol RNA 提取试剂盒（Invitrogen）按照厂商提供的使用说明提取。由 *Reverse Transcriptase XL (AMV)* (TaKaRa Biotechnology)对 1 μg 的总 RNA 逆转录成 cDNA。使用 *TaKaRa Taq*™ (TaKaRa)酶进行 PCR 扩增，并对扩增产物进行半定量分析。基因特异的引物设计参考公布的序列。引物序列，反应条件和产物片段大小见表 1。PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶（Sigma）电泳，溴化乙锭染色观察电泳条带。

1.7　基因组 DNA 的提取

用 DNeasy® Tissue kit （Qiagen）按厂家提供的操作步骤提取 5 组 MESF 细胞（丝裂霉素 C 处理过）的基因组 DNA。为检测转染的质粒是否整合到细胞基因组中，将提取的 DNA 每组取 1 μg 用于 PCR。检测用的引物见表 2。

1.8　实时定量 PCR（real-time quantitative PCR）

由 MJ Research DNA Engine Opticon™ Continuous Fluorescence Detection System (MJ Research Inc, Walthan, MA)进行实时定量 PCR。由相应的软件对目的基因的 cDNA 进行定量。FGF2 转录物的量经 GAPDH 转录物水平标准化，所用的 GAPDH 引物为：正义链 5′-ACTTCAACAGCGA-CACCCACTC-3′；反义链 5′-CCCTGTTGCTGT-AGCCAAATTC-3′，扩增条带 117 bp。FGF2 扩增产物为 158 bp，引物：正义链 5′-ACT TCA ACA GCG ACA CCC ACTC-3′；反义链 5′-CCC TGT TGC TGT AGC CAA ATTC-3′。反应体系为：1 μL 总 cDNA 溶液，2 μL 引物对（10 μmol/L），和 7 μL ddH_2O，加入到 10 μL iQ™ SYBR® Green Supermix (from iQ™ SYBR® Green Supermix Kit；Bio-Rad, USA)中。一份未经逆转录的 RNA 样品也按上述体系进行 real-time PCR，作为阴性对照。

1.9　Western 印迹法（Western blot）

六孔板上的细胞用冰冷的PBS洗2遍，用0.25％冰冷的trypsin（in 0.04% EDTA；Gibco）消化，然后4℃ 1 000×*g*离心5 min，收集沉淀，再用冰冷的PBS洗2遍。在洗好的细胞沉淀中加入200 μL改良RIPA缓冲液（7.9 mg/mL Tris base，9 mg/mL NaCl，pH7.4，1% NP-40，0.25% Na-deoxycholate，1 mmol/L EDTA，1 μL/mL aprotinin，1 μL/mL leupeptin，1 μL/mL pepstatin；5 μL/mL PMSF，5 μL/mL Na_3VO_4，5 μL/mL NaF），置于冰上30 min，并不时搅拌，使细胞充分裂解。4℃ 12000 g离心8 min，收集上清于新的1.5 mL EP管中。-20℃保存备用，并取5 μL用于蛋白质定量分析。将提取的蛋白样品用SDS－聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE），再用半干法转膜至Immobilon™-P Transfer Membrane (Millipor Corp, USA)。转后的膜在封闭液（TBS，0.05% Tween-20

表 1 用到的引物序列

Tab. 1 List of sequences of primers

基因 Genes	引物序列 Primer sequences	退火温度 Annealing temp (℃)	产物大小 Products (bp)	序列来源或参考文献 Accession No. or reference
GAPDH	5′-TGAAGGTCGGAGTCAACGGA-3′ 5′-TGGTGCAGGAGGCATTGCTG-3′	56	446	Wang, 2007
Nanog	5′-TTCAAGACAGCCCTGATTCTTC-3′ 5′-GCATCTGCTGGAGGCTGAGG-3′	54	198	AY230262.1 AY278951.1 AB275459.1
SOX2	5′-AGCATGATGCAGGAGCAG-3′ 5′-GGAGTGGGAGGAAGAGGT-3′	56	270	NM_011443.3 XM_001106891.1 NM_003106.2
OCT-4	5′-GACAACAATGAGAACCTTCA-3′ 5′-CACATCCTTCTCTAGCCCAA-3′	54	185	NM_013633.2 AB243404.1 NM_002701.4
FGF2	5′-GCTAACCGTTACCTTGCTAT-3′ 5′-CCAGTTCGTTTCAGTGCC-3′	48	158	AF251270.1 AY820133.1
c-fos	5′-AAAGGAGAATCCGAAGGGAA-3′ 5′-AACAGGAAGTCATCAAAGGG-3′	406	55	NM_010234.2 NM_005252.2 NM_001098399.1
TGFβ1	5′-GCTTTCGCCTTAGCGCCCACT-3′ 5′-GCGGTGCCGGGAGCTTTGCA-3′	185	60	NM_000660.3 XM_001118338.1
BMP4	5′-TCCTGGTAACCGAATGCTGA-3′ 5′-AAGTGTCGCCTCGAAGTCCC-3′	178	56	NM_007554.2 NM_130851.2 XM_001084317.1
TGFβ2	5′-TGCTAATGTTATTGCCCTCCTA-3′ 5′-TTGTACCCTTTGGGTTCGTG-3′	181	53	XM_001103911.1 NM_009367.e3 NM_003238.1
Tubb3	5′-GTGCCTCAGGCCATTCTGGT-3′ 5′-CATGATGCGGTCGGGATACTC-3′	315	59	XR_011702.1 NM_006086.2 NM_023279.2
Brachyury	5′-TCCTTCCTGCTGGACTTCGTG-3′ 5′-CTCCGTTGAGCTTGTTGGTGAG-3′	199	58	NM_009309.2 XM_001101514.1 NM_003181.2
Goosecoid	5′-CGCACCAGATGCTGCCCTACA-3′ 5′-GCGGTTCTTAAACCAGACCTCCAC-3′	239	60	XM_001100695.1 X99239.1 NM_173849.2
Sox7	5′-CCTCCTGAGCACCCTGGCTT-3′ 5′-AGTACGTGGCCGTGGCATCA-3′	229	58	XM_001088867.1 NM_011446.1 NM_031439.2
CDX2	5′-GAAAACCAGGACGAAAGACAAATA-3′ 5′-CTTTGCTCTGCGGTTCTGAA-3′	178	55	NM_007673.3 NM_001265.2 XM_001096874.1
Nestin	5′-AGCAGCTGCAGGCTGAGCGCG-3′ 5′-GGGATGGGGGTGCTGGCCAAGGT-3′	496	61	NM_006617.1 XM_001116693.1 NM_016701.3
Sox1	5′-ATGTACAGCATGATGATGGAGACCGA-3′ 5′-GCCAGCGAGTACTTGTCCTTCTTGAG-3′	416	62	NM_005986.2 NM_204333.1 NM_009233.3
CER1	5′-GGCAGAGAGAGAAGATGCTGTCCAG-3′ 5′-ATTTCCCAAAGCAAAGGTTGTTCTG-3′	348	57	NM_005454.2 XM_001110846.1 NM_009887.2
INHBA	5′-GGGGAGAACGGGTATGTGGA-3′ 5′-AGGCGGATGGTGACTTTGGT-3′	239	56	NM_002192.2 NM_008380.1 XM_001098421.1
Grem1	5′-GACAAGGCTCAGCACAATGA-3′ 5′-GAAGGAGCAGGACTGAAAGGA-3′	321	57	NM_011824.3 NM_013372.5 NM_001032848.1

表 2　载体的测序引物

Tab. 2　List of sequencing primers of vectors

引物 Primer	序列 Sequences	退火温度 Annealing temperature(℃)	产物大小 Products(base pairs)
M13-F	GTTTTCCCAGTCACGAC	50	560*
M13-R	GAGTTAGCTCACTCATTAGGC		
pcDNA3. 1(+)-F	TAATACGACTCACTATAGGG	51	177**
pcDNA3. 1(+)-R	TAGAAGGCACAGTCGAGG		618***

*理论上应检测到 psilencer-shFGF2 和 psilencer-negative 载体的目的片段大小（the length of both psilencer-shFGF2 and psilencer-negative vectors target fragments should be detected, theoretically）；**理论上应检测到 pcDNA3. 1(+) 载体的目的片段大小（the length of pcDNA3. 1(+) vector target fragment should be detected, theoretically）；***理论上应检测到 pcDNA3. 1(+)-FGF2 载体的目的片段大小（the length of pcDNA3. 1(+)-FGF2 vector target fragment should be detected, theoretically）。

和5%脱脂奶粉）中浸泡2h，然后用一抗4℃孵育过夜。用辣根过氧化物酶连二抗和底物Supersignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE Corp，USA)检测，并于暗室底片曝光。一抗GAPDH（鼠抗人单抗）购自上海康成生物公司，FGF2（鼠抗人单）购自Calbiochem，OCT4（Oct-3/4(N-19)，羊抗人多抗）购自Santa Cruz Biotechnology Inc，AKT及其磷酸化的AKT（兔单抗鼠抗）、抗兔的二抗均购自Cell Signaling Technology Inc。抗羊和抗鼠的二抗购自Pierce公司。

1.10　免疫组化染色

培养的 RhESC 集落，先用 4%多聚甲醛固定 10min，在含 0.2%Triton X-100 的 PBS 中透膜处理 10min，然后用 10%羊血清封闭 40min 后，一抗于 37℃作用 1h 或在 4℃过夜。去掉一抗后，细胞用 PBS 冲洗 3 次，然后加入用 flurrescein isothiocyanate(FITC)或 phycoerythin(PE)标记的对应的二抗于 37℃作用 30min。采用不添加一抗，而仅添加二抗的细胞作为阴性对照组，检测二抗的非特异性结合能力。细胞核用 DAPI 染色。免疫标记过的细胞通过共聚焦显微镜（Zeiss, LSM 510 META）进行检测。OCT4 和 SALL4 的一抗为羊抗人的多克隆抗体，二抗为驴抗羊 IgG-FITC（绿色）、IgG-TR（红色），均购自 Santa Cruz Biotechnology Inc。

1.11　统计分析

统计数据以平均值±标准误（SEM）表示。采用 SPSS 13.0 软件进行 LSD 分析。$P<0.05$ 限定为差异性显著。

2　结　果

2.1　各组 MESF 饲养层基因的表达

各组 MESF 细胞形态无明显差异（图 1A），其中 FGF2 mRNA 表达情况见图 1C。FGF2，c-fos，TGF-β1，INHBA，CER1，Gremlin1，TGFβ1 在 f1 中上调，在 f3 中下调；BMP4 和 TGFβ2 在 f1 中下调，在 f3 中上调。对照组 f2，f4 和 f5 的 FGF2 mRNA 表达量无显著差异；f1 的 FGF2 mRNA 表达量比对照组高一倍；f3 的 FGF2 mRNA 表达量比对照组低 1/2（图 1E）。相应的，FGF2 蛋白表达情况也是 f1 最高，f2，f4 和 f5 相同，f3 最低（见图 1B）。对各组细胞基因组检发现 f1，f2，f3，f4 均有各自对应的质粒整合在基因组中（见图 1D），表明不同 FGF2 表达量的 MESF 饲养层细胞系已成功建立。

2.2　RhESC 在不同的 MESF 饲养层上生长情况和免疫组化检测

五组 MESF 饲养层上长期培养的 RhESC（38—47 代，分别记为 rh1、rh2、rh3、rh4、rh5）在形态上都没有明显差异（图 2A），表达 ESC 的标记 OCT4 和 NANOG，说明绝大部分细胞仍然保持未分化状态。RhESC 的细胞倍增时间（44—48 代）统计结果显示，rh1 的生长速度明显比其它各组快（见图 2B），而 rh3 的生长速度较 3 个对照组慢（图 2B）。

2.3　RhESC 基因的表达

各组 RhESC 都表达胚胎干细胞的标记：Oct-4，Nanog，Sox2（图 3A、C）。Oct-4、Nanog、Sox2 在 rh1 中表达量最高，而在 rh3 中的表达量最低（图 3A、C）。FGF2、c-fos、TGF-β1、INHBA、CER1、Gremlin1、TGFβ1 在 rh1 中高表达，在 rh3 中低表

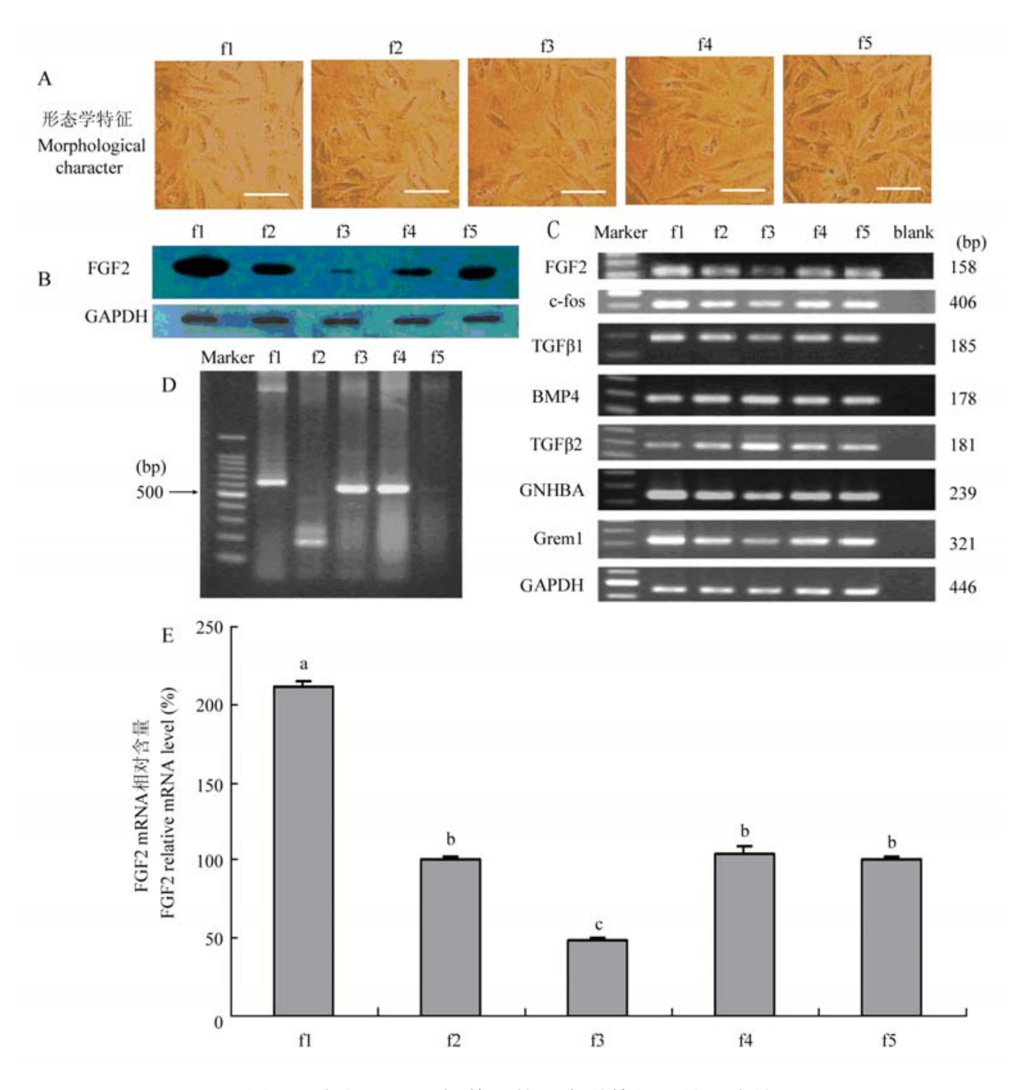


图 1 各组 MESF 饲养层的形态学特征和基因表达

Fig. 1 Morphologic characters and gene expression of different FGF2-expressing MESF cell lines

A：各组饲养层的形态学特征（morphological characters of feeder layers）；标尺，100μm （Scale bar, 100μm）；B：蛋白质印迹法检测 FGF2 的表达情况，GAPDH 作为内参（FGF2 expression was detected by immunoblotting. Amount of GAPDH is shown as a loading control）；C：RT-PCR 检测 FGF2，c-FOS，TGFβ1，BMP4，TGFβ2，INHBA，GREM1 基因表达的情况；GAPDH 作为内参（gene expression of FGF2, c-FOS, TGFβ1, INHBA, GREM1 was detected by RT-PCR. Amount of GAPDH is shown as a loading control）；D：PCR 检测基因组 DNA 中质粒整合情况（plasmid integration in genome of MESFs was detected by PCR）；E：real time PCR 检测 FGF2 在 MESF 中的表达情况（FGF2 expression was detected by realtime PCR）；柱上不同字母的标识，表示不同组之间具有显著性差异（P<0.05）[the different words above bars indicate significance among different groups (P<0.05)]；目的基因相对含量（target gene relative level）(%)=目的基因净含量（target gene net）/GAPDH 净含量（GAPDH net）×100%。

f1：转入质粒 pcDNA3.1(+)-FGF2 的 MESF（f1: the FGF2 overexpressed line）；f2：转入 pcDNA3.1(+)的 MESF，为 f1 的阴性对照（f2: the negative control of f1）；f3：转入 psilencer-shFGF2 的 MESF（f3: RNA interfered line）；f4：转入 psilencer-negative 的 MESF，为 f3 的阴性对照（f4: the negative control of f3）；f5：未作任何转染的 MESF，阴性对照（f5: the non-treated control）。

达；BMP4，TGFβ2 在 rh1 中低表达，（图 3A、C）。另外，rh1 的 Akt 磷酸化水平高于其它 4 组(图 3B)。

2.4 不同 MESF 饲养层上培养的 RhESC 多分化潜能比较

五组 MESF 上长期培养的 RhESC（10 代）形成的拟胚体（EBs，分别记为 RH1，RH2，RH3，RH4，RH5）在形态上没有明显差别（图 4A）。检测结果显示各组 EB 均表达各个胚层早期特异性标记，其表达量在 RH1 中偏低（图 4B）。

3 讨 论

饲养层为保持ES细胞的自我更新提供了必需

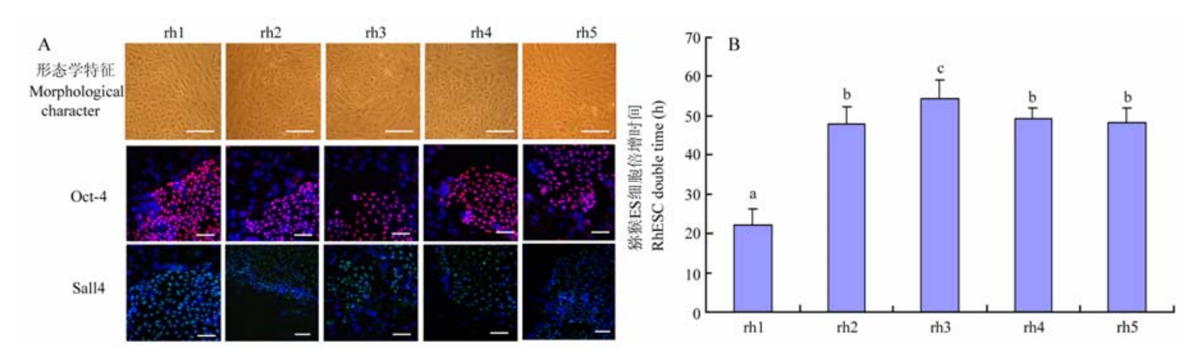


图 2　猕猴 ES 细胞在 5 组不同 FGF2 表达量的饲养层上的形态，免疫组化检测和细胞倍增时间

Fig. 2　Morphological characters, immunohistochemistry determination and cell double time of rhesus monkey ESCs which were supported in the five groups of different FGF2-expressing feeder layers

A：猕猴 ES 细胞（RhESC）的形态特征，Oct-4 和 Sall4 免疫组化检测[morphological characters, Oct-4 and Sall4 immunohistochemistry determination of rhesus monkey ESCs (RhESCs)]。rh1，rh2，rh3，rh4，rh5 分别为在 f1，f2，f3，f4，f5 上生长的 RhESC（rh1, rh2, rh3, rh4, rh5 represent RhESCs on f1, f2, f3, f4, f5, respectively）；红色为 Oct-4（red, Oct-4），绿色为 Sall4（green, Sall4），蓝色为 DAPI（blue, DAPI）；标尺，100μm（scale bar, 100μm）。

B：RhESC 倍增时间（double time of RhESCs）：rh1，22±3.8h；rh2，48±4.6h；rh3，54±4.8h；rh4，49±2.6h；rh5，48±4h。柱上不同字母的标识，表示不同组之间具有显著差异（$P<0.05$）[the different words above bars indicate significance among different groups ($P<0.05$)]。

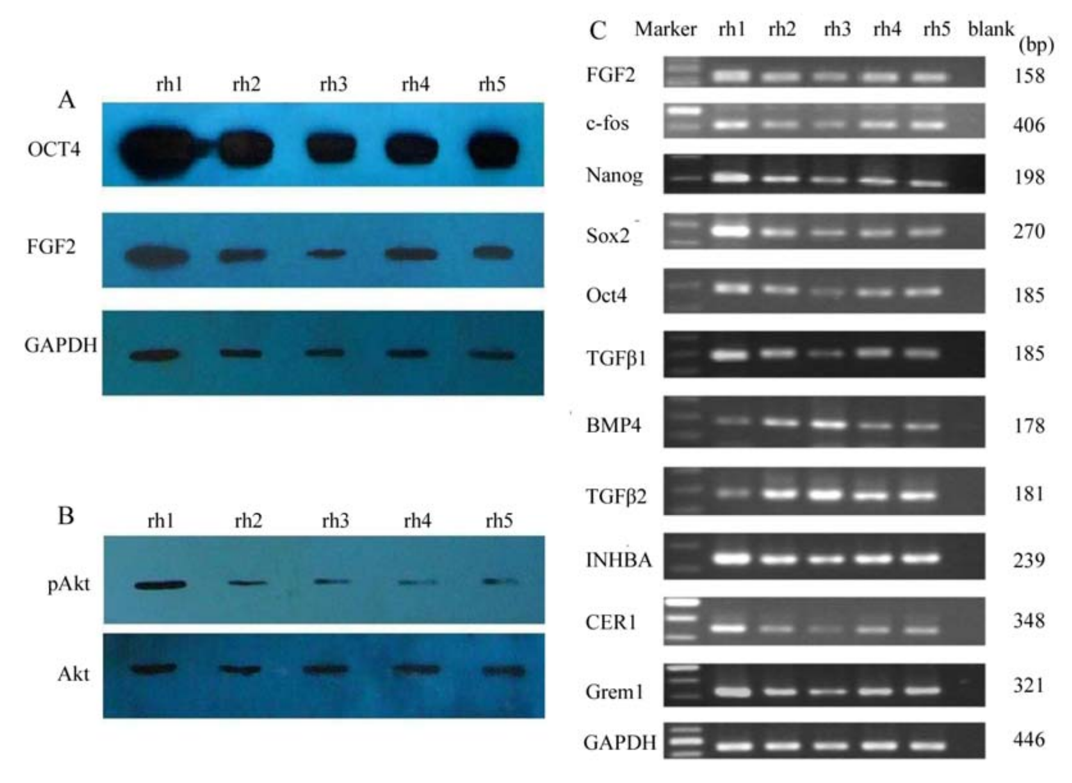


图 3　RhESC 基因表达情况

Fig. 3　Gene expression of RhESCs

A：蛋白质印迹法检测 OCT-4 和 FGF2 基因表达情况，GAPDH 作为内参（determination of OCT-4 and FGF2 expression by immunoblotting with OCT-4 and FGF2 antibody. Amount of GAPDH is shown as a loading control）；B：蛋白质印迹法检测 Akt 磷酸化水平，Akt 作为内参（activation of Akt were measured by immunoblotting with phospho-specific antibody. The amount of Akt is shown as a loading control.）；C：半定量 RT-PCR 检测 RhESC 中 FGF2，OCT-4，Nanog，Sox2，c-fos，TGF-β1，INHBA，CER1，Gremlin1，BMP4 和 TGFβ2 基因表达情况，GAPDH 作为内参（expression of FGF2, OCT-4, Nanog, Sox2, c-fos, TGF-β1, INHBA, CER1, Gremlin1, BMP4 and TGFβ2 were detected by semi-quantitative RT-PCR. Amount of GAPDH is shown as a loading control）。

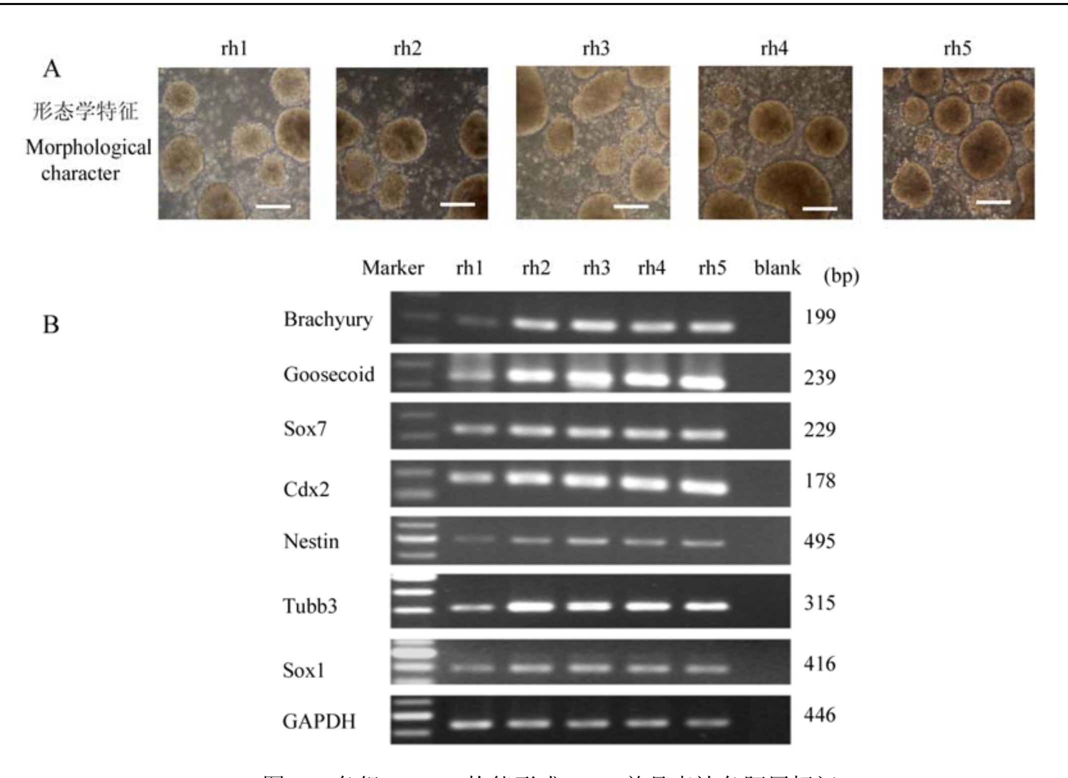


图 4 各组 RhESC 均能形成 EB，并且表达各胚层标记

Fig. 4 RhESCs of each group could formulate EBs, and expressed markers of each germ layer

A：各组 EB 的形态学特征（morphological characters of EBs of each group）；标尺，200μm（scale bar, 200μm）；B：RT-PCR 检测 EB 中各胚层标记表达情况，GAPDH 作为内参(expression of markers of each germ layer in EBs were detected by RT-PCR. Amount of GAPDH is shown as a loading control)。Sox1，Nestin，Tubb3，神经外胚层标记(neuroectodermal marker)；Brachyury，Goosecoid，中胚层标记(mesoderm marker)；Sox7，内胚层标记(endodermal marker)；Cdx2，滋养外胚层标记(trophectoderm marker)。RH1，RH2，RH3，RH4，RH5 分别为由 rh1，rh2，rh3，rh4，rh5 形成的 EB (RH1, RH2, RH3, RH4, RH5 represent EBs formated from rh1, rh2, rh3, rh4, rh5 respectively)。

成分。但是，使用饲养层的ESC培养体系还存在一些问题，如不同来源的饲养层培养效果不一致（Li et al, 2005a）等。本实验室Li et al(2005a)发现FGF2的表达量在支持猕猴ESC生长的饲养层中比不支持猕猴ESC生长的饲养层中高得多，暗示ESC的生长能力可能与饲养层中FGF2表达量高低有重要关系。本研究结果证实FGF2对RhESC的增殖有明显的促进作用（图3）。Wang et al（2005a）报道FGF2信号通路在保持人和小鼠ESC的生长和自我更新过程中也发挥着重要作用。FGF2可通过MEK1/ERK信号通路上调下游原癌基因c-fos的表达，从而促进人ESC的增殖和自我更新（Kang et al, 2005）；FGF2也可能通过激活PI3K/Akt/PKC信号通路，引起胞外基质（integrinα6/β1）的大量表达，从而维持人ESC的自我更新（Kim et al, 2005）。我们的结果进一步发现f1及在f1上培养的RhESC高表达与细胞增殖相关的基因c-fos（图1B，3C），并且f1上的RhESC的AKT磷酸化水平升高（图3B）。因此，FGF2也可能通过上述两个信号通路维持RhESC细胞增殖及自我更新。

据报道TGF-β1和BMP4作为TGF-β超家族成员，能抑制ESC分化，并保持ESC的自我更新（Ying et al, 2003；Brandenberger et al, 2004；Qi et al, 2004；Jame et al, 2005）。TGF-β1和activin A通过激活SMAD2/3来阻止人ESC的分化（Valdimarsdottir et al, 2005；James et al, 2005；Amit et al, 2004；Vallier et al, 2005），INHBA是组成activin A的亚基（Pang et al, 1982）；而BMP4通过SMAD 1/5/8信号通路启动ESC向滋养层（trophoblast）或原始内胚层（primitive endoderm）分化（Xu et al, 2002；Pera et al, 2004）。Greber et al（2007）认为外源和自分泌的FGF2可调节TGFβ受体的表达，以维持OCT-4、NANOG和SOX2的表达，进而激活内源FGF2的表达，形成循环反馈，促进人ESC的自我更新。Xu et al（2005b）发现FGF2能够和BMP拮抗剂Gremlin(Grem1)一起使用加强对BMP信号的抑制作用，并且维持人ESC的增殖。CER1（Ceberus 1，Nodal和BMP的拮抗剂）在ESC中大量存在，对维持ESC的未分化状态具有

一定作用（Belo et al, 2000；Bhattacharya et al, 2004）。此外，TGF-β2也被认为对人ESC的增殖有一定的作用（Chen et al, 2006）。

经RT-PCR检测，我们发现在MESF中内源FGF2可影响TGF-β信号通路，促进TGF-β家族的TGF-β1、INHBA、Gremlin1表达，抑制TGF-β2、BMP4表达（图1C）。在高表达FGF2的饲养层上的RhESC的生长速度明显加快，低表达FGF2的饲养层上的RhESC生长则比对照组慢（图2B）。对RhESC的基因表达检测发现TGF-β1，INHBA和Gremlin1在rh1中高表达，在rh3中低表达；BMP4和TGF-β2在rh1中低表达，在rh3中高表达（图3A、C），表明旁分泌的FGF2也能够促进Oct-4、Sox2、Nanog、TGF-β1、INHBA、Gremlin1和内源FGF2的表达，对BMP4和TGF-β2表达有抑制作用。而rh1的Akt磷酸化水平（图3B）和c-fos（图3C）的表达上调说明ESC的增殖确实受到调控。上述结果表明FGF2可通过激活MEK1/ERK信号通路促进细胞增殖，并通过调控TGF-β信号通路（主要是作用于TGF-β1）实现对猕猴ESC的自我更新。

研究表明自分泌的FGF2信号也能够维持人ESC的自我更新（Dvorak et al, 2005)。Greber et al（2007）认为外源和自分泌的FGF2通过调节TGF-β受体信号维持OCT-4，NANOG和SOX2的表达，进而激活内源FGF2的表达，形成循环反馈，促进人ESC的自我更新。另外，SMAD2/3的激活可能导致NANOG的上调（Chambers et al, 2003；Mitsui et al, 2003）。过表达NANOG蛋白可使猴ESC在无饲养层条件下维持自我更新，而对NANOG进行RNA干扰会导致ESC向滋养外胚层分化（Yasuda et al, 2006)。NANOG能够与SALL4形成SALL4-NANOG复合体，通过结合不同的启动子位点对ESC中许多基因进行转录调节，并以自反馈体机制调节自身的基因表达（Wu et al, 2006），这与OCT-4-SOX2复合体（Chew et al, 2005）功能类似。OCT-4、NANOG和SOX2在人ESC中形成转录调节的核心，启动数百个目的基因的转录（Boyer et al, 2005）。本研究发现FGF2、Oct-4、Sox2和Nanog在rh1中高表达，在rh3中低表达（图3A、C），表明饲养层中的FGF2对猕猴ESC的Oct-4、Nanog、Sox2以及ESC的内源FGF2可能存在正反馈调节机制。

虽然改变FGF2在饲养层中的表达对ESC的多潜能性维持无影响，但对其分化效率有一定影响（图4B）。不同组的EB均表达代表各个胚层的标记，但RH1的各标记表达量都有所下降。然而，EB的数量在统计学上并没有显著差异（数据没有显示）。但RH1生长速度更快，数量更多，因此实际上的EB形成率比其他各组低。我们推测FGF2在促进ESC生长的同时，也延缓了ESC的早期分化速度，使过表达饲养层上的ESC分化出的EB相对数量较少。将来还需要对这些EB进行更长时期的分化培养，对分化的细胞进行更全面的检测，以了解ESC分化为各种细胞的多潜能性的具体变化过程。

本研究通过对不同 FGF2 表达量的 MESF 饲养层培养的猕猴 ESC 的研究，结果表明饲养层的 FGF2 对猕猴 ESC 的增殖有重要影响。提高饲养层 FGF2 表达可以调节 FGF 和 TGF-β 信号通路的相关因子表达，激活猕猴 ESC 的 FGF 和 TGF-β 信号通路，促进细胞增殖。本研究结果将为改进 ESCs 的培养条件和深入了解 ESCs 的生物学特性提供重要参考。

致谢：感谢武汉大学生命科学院病毒学和分子病理学实验室的朱应教授提供质粒 psilencer-2.1 U6 neo vector；感谢昆明动物所郑永唐研究员提供质粒 pcDNA-3.1(+)。

参考文献：

Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA. 2000. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture [J]. *Dev Biol*, **227**(2): 271-278.

Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J. 2004. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells [J]. *Biol Reprod*, **70**(3): 837-845.

Belo JA, Bachiller D, Agius E, Kemp C, Borges AC, Marques S, Piccolo S, De Robertis EM. 2000. Cerberus-like is a secreted BMP and nodal antagonist not essential for mouse development [J]. *Genesis*, **26**(4): 265-270.

Bendall SC, Stewart MH, Menendez P, George D, Vijayaragavan K, Werbowetski-Ogilvie T, Ramos-Mejia V, Rouleau A, Yang J, Bossé M, Lajoie G, Bhatia M. 2007. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells *in vitro* [J]. *Nature*, **448**(7157): 1015-1021.

Bhattacharya B, Miura T, Brandenberger R, Mejido J, Luo Y, Yang AX, Joshi BH, Ginis I, Thies RS, Amit M, Lyons I, Condie BG, Itskovitz-Eldor J, Rao MS, Puri RK. 2004. Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature [J]. *Blood*, **103**(8): 2956-2964.

Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA,

Jaenisch R, Young RA. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells [J]. *Cell*, **122**(6): 947-956.

Brandenberger R, Wei H, Zhang S, Lei S, Murage J, Fisk GJ, Li Y, Xu C, Fang R, Guegler K, Rao MS, Mandalam R, Lebkowski J, Stanton LW. 2004. Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ESC growth and differentiation [J]. *Nat Biotechnol*, **22**(6): 707-716.

Burdon T, Smith A, Savatier P. 2002. Signaling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells [J]. *Trends Cell Biol*, **12**(9): 432-438.

Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells [J]. *Cell*, **113**(5): 643-655.

Chew JL, Loh YH, Zhang W, Chen X, Tam WL, Yeap LS, Li P, Ang YS, Lim B, Robson P, Ng HH. 2005. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells [J]. *Mol Cell Biol*, **25**(14): 6031-6046.

Dvorak P, Dvorakova D, Koskova S, Vodinska M, Najvirtova M, Krekac D, Hampl A. 2005. Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, **23**(8): 1200-1211.

Greber B, Lehrach H, Adjaye J. 2007. Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor β signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-Renewal [J]. *Stem Cells*, **25**(2): 455-464.

James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A. 2005. TGFbeta/activin/nodal signaling isnecessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stemcells [J]. *Development*, **132**(6): 1273-1282.

Jirmanova L, Pacholikova J, Krejci P, Hampl A, Dvorak P. 1999. O-linked carbohydrates are required for FGF2-mediated proliferation of mouse embryonic cells [J]. *Int J Dev Biol*, **43**(6): 555-562.

Kang HB, Kim JS, Kwon HJ, Nam KH, Youn HS, Sok DE, Lee Y. 2005. Basic fibroblast growth factor activates ERK and induces c-fos in human embryonic stem cell line MizhES1 [J]. *Stem Cells Dev*, **14**(4): 395-401.

Karin M, liu Z, Zandi E. 1997. AP-1 function and regulation [J]. *Curr Opin Cell Biol*, **9**(2): 240-246.

Khezri S, Valojerdi MR, Sepehri H, Baharvand H. 2007. Effect of basic fibroblast growth factor on cardiomyocyte differentiation from mouse embryonic stem cells [J]. *Saudi Med J*, **28**(2): 181-186.

Kim SJ, Cheon SH, Yoo SJ, Kwon J, Park JH, Kim CG, Rhee K, You S, Lee JY, Roh SI, Yoon HS. 2005. Contribution of the PI3K/Akt/PKB signal pathway to maintenance of self-renewal in human embryonic stem cells [J]. *FEBS Lett*, **579**(2): 534-540.

Li T, Wang S, Xie Y, Lu Y, Zhang X, Wang L, Yang S, Wolf D, Zhou Q, Ji W. 2005a. Homologous feeder cells support undifferentiated growth and pluripotency in monkey embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, **23**(8): 1192-1199.

Li Y, Powell S, Brunette E, Lebkowski J, Mandalam R. 2005b. Expansion of human embryonic stem cells in defined serum-free medium devoid of animal-derived products [J]. *Biotechnol Bioeng*, **91**(6): 688-698.

Chen S, Choo A, Chin A, Oh SK. 2006. TGF-beta2 allows pluripotent human embryonic stem cell proliferation on E6/E7 immortalized mouse embryonic fibroblasts [J]. *J Biotechnol*, **122**(3): 341-361.

Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells [J]. *Cell*, **113**(5): 631-642.

Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines [J]. *Stem Cells*, **19**(3): 193-204.

Pang Z, Pardinas JR, Dermody J, Ozer HL. 1993. Dinucleotide repeat polymorphism in the INHBA gene [J]. *Hum Mol Genet*, **2**(11): 1982.

Pera MF, Andrade J, Houssami S, Reubinoff B, Trounson A, Stanley EG, Ward-van Oostwaard D, Mummery C. 2004. Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin [J]. *J Cell Sci*, **117**(Pt 7): 1269-1280.

Qi X, Li TG, Hao J, Hu J, Wang J, Simmons H, Miura S, Mishina Y, Zhao GQ. 2004. BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**(16): 6027-6032.

Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro [J]. *Nat Biotechnol*, **18**(4): 399-404.

Suemori H, Tada T, Torii R, Hosoi Y, Kobayashi K, Imahie H, Kondo Y, Iritani A, Nakatsuji N. 2001. Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI [J]. *Dev Dyn*, **222**(2): 273-279.

Valdimarsdottir G, Mummery C. 2005. Functions of the TGFbeta superfamily in human embryonic stem cells [Review] [J]. *APMIS*, **113**(11-12): 773-789.

Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. 2005. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells [J]. *J Cell Sci*, **118**(Pt 19): 4495-4509.

Wang G, Zhang H, Zhao Y, Li J, Cai J, Wang P, Meng S, Feng J, Miao C, Ding M, Li D, Deng H. 2005a. Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **330**(3): 934-942.

Wang L, Li L, Menendez P, Cerdan C, Bhatia M. 2005b. Human embryonic stem cells maintained in the absence of mouse embryonic fibroblasts or conditioned media are capable of hematopoietic development [J]. *Blood*, **105**(12): 4598-4603.

Wang S, Tang X, Niu Y, Chen H, Li B, Li T, Zhang X, Hu Z, Zhou Q, Ji W. 2007. Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, **25**(2): 481-489.

Wu Q, Chen X, Zhang J, Loh YH, Low TY, Zhang W, Zhang W, Sze SK, Lim B, Ng HH. 2006. Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells [J]. *J Biol Chem*, **281**(34): 24090-24094.

Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK. 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, **19**(10): 971-974.

Xu C, Rosler E, Jiang J, Lebkowski JS, Gold JD, O'Sullivan C, Delavan-Boorsma K, Mok M, Bronstein A, Carpenter MK. 2005a. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium [J]. *Stem Cells*, **23**(3): 315-323.

Xu RH, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, Zwaka TP, Thomson JA. 2002. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast [J]. *Nat Biotechnol*, **20**(12): 1261-1264.

Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA. 2005b. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells [J]. *Nat Methods*, **2**(3): 185-190.

Yasuda SY, Tsuneyoshi N, Sumi T, Hasegawa K, Tada T, Nakatsuji N, Suemori H. 2006. NANOG maintains self-renewal of primate ES cells in the absence of a feeder layer [J]. *Genes Cells*, **11**(9): 1115-1123.

Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3 [J]. *Cell*, **115**(3): 281-292.